BIOKAR DIAGNOSTICS

Gélose rose-Gal BCIG

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose rose-Gal BCIG est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement simultané et spécifique des *Escherichia coli* et des coliformes thermotolérants dans l'eau, le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires.

HISTORIQUE

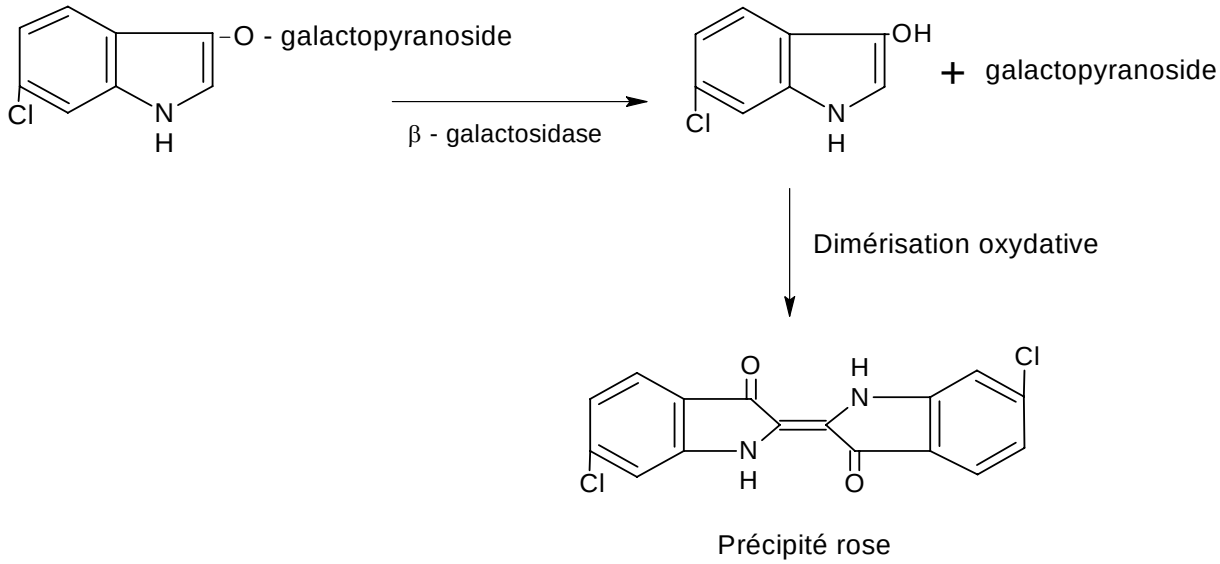
La classification des coliformes est traditionnellement fondée sur leur capacité à fermenter le lactose avec production d'acide. La fermentation du lactose fait intervenir successivement deux enzymes : d'abord une perméase responsable de la pénétration du sucre dans la bactérie, puis une β-galactosidase qui le scinde en glucose et galactose, entrant dans le processus de fermentation proprement dit.
Dès 1962, Le Minor et Ben Hamida ont démontré les avantages de la recherche de la β-galactosidase sur celle de la fermentation du lactose pour le diagnostic bactériologique des entérobactéries. Des souches lactose lent ou lactose-négatif sont recensées parmi toutes les espèces de coliformes. Les milieux traditionnels ignorent ces biotypes β-galactosidase-positive mais perméase-négative qui, pourtant, sont de même signification hygiénique. En 1989, Leclerc et Mossel ont donc proposé que la présence d'une β-galactosidase chez les coliformes soit utilisé comme critère de leur classification. L'utilisation d'un substrat synthétique chromogène, insensible aux variations dans la perméabilité au lactose, permet de mettre en évidence cette enzyme par une réaction colorée. Le 6-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (rose-galactopyranoside) est un de ces substrats. Hydrolysé par la β-galactosidase, il produit une coloration rose.
Buehler *et al.,* en 1949, furent les premiers à relever la présence d'une β-D-glucuronidase chez *Escherichia coli*. Depuis, des études ont montré que 94 à 97% des *Escherichia coli* possèdent une β-D-glucuronidase et qu'elle n'est que très rarement retrouvée chez d'autres espèces (on l'a détectée chez un nombre réduit de souches de *Citrobacter*, d'*Enterobacter*, de *Klebsiella*, de *Salmonella*, de *Shigella* et de *Yersinia*). En 1990, Restaino a utilisé avec succès un substrat chromogène : le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronate (BCIG) qui, incorporé dans une gélose, lui a permis d'effectuer en 24 heures, la numération des *Escherichia coli* présents dans les produits carnés.

PRINCIPES

- La présence simultanée de deux substrats chromogènes permet la détection des deux activités enzymatiques spécifiques : la β-galactosidase et la β-glucuronidase.

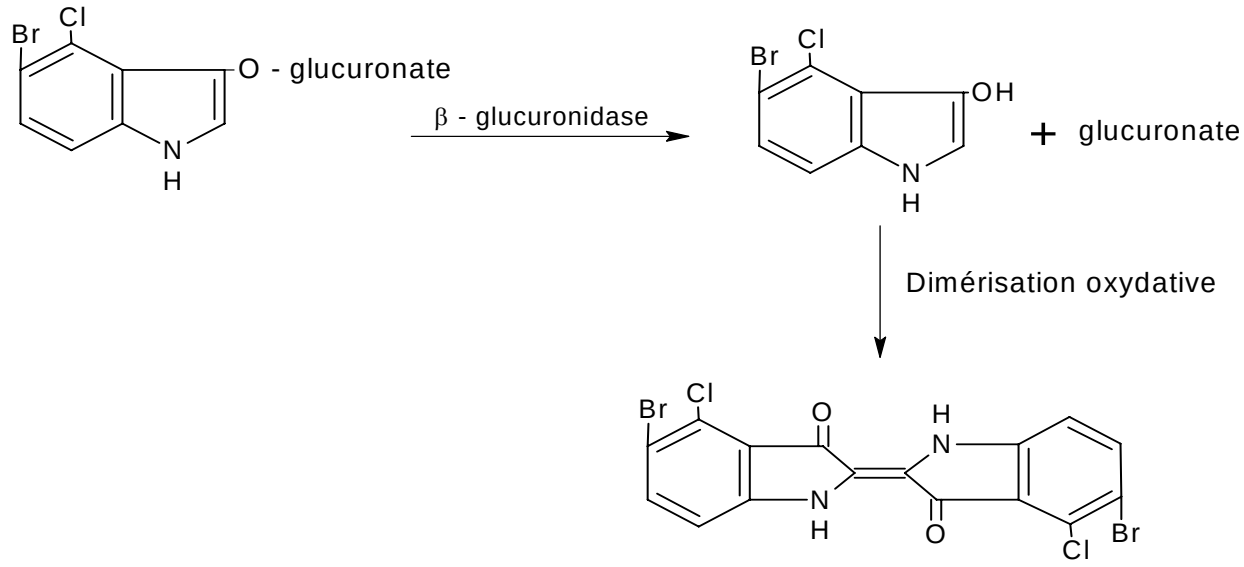
BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

- Les bactéries appartenant au groupe des coliformes se distinguent par la production d'une β-galactosidase (β-gal). Cette enzyme réagit avec le rose-galactopyranoside pour former un précipité de couleur rose selon le mécanisme suivant :



Précipité rose

- Toutes les souches d'*Escherichia coli* possèdent une β-galactosidase et 94 à 97% d'entre elles possèdent également une β-glucuronidase (GUD). Cette enzyme clive le BCIG pour produire un composé de couleur bleue selon la réaction suivante :



Précipité bleu de dichloro-dibromo indigo

- L'action simultanée des deux enzymes fait apparaître les colonies d'*Escherichia coli* en violet.

Microorganismes	Phénotype typique	Coloration des colonies
Escherichia coli	GUD $^{+}$ / β-gal $^{+}$	violette
Coliformes non *Escherichia coli*	GUD $^{-}$ / β-gal $^{+}$	rose
Autres bactéries à Gram négatif	GUD $^{-}$ / β-gal $^{-}$	blanche

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

- La polypeptone favorise l'excellente croissance des coliformes.
- L'extrait autolytique de levure est une source de vitamines du groupe B.
- Les sels biliaires inhibent la croissance des bactéries à Gram positif.
- Les phosphates agissent comme substances tampon afin de se placer dans les conditions optimales des réactions enzymatiques.
- Le chlorure de sodium et le sulfate de magnésium facilitent le développement de la coloration.

NOTA :

Les souches d'*Escherichia coli* β-glucuronidase négative et aussi le sérotype entérohémorragique 0157:H7 cultivent sur le milieu, en présentant des colonies roses. Les autres bactéries à Gram négatif capables de cultiver à (44,0 ± 0,5)°C, telles que les salmonelles, sont blanches.

PREPARATION

- Mettre en suspension 24,0 g de milieu déshydraté (BK142) dans un litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

NOTA :

Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement.

MODE D'EMPLOI

- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47°C.
- Transférer 1 mL de produit à analyser et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Petri stériles.
- Couler 12 mL de milieu.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Couler à nouveau 4 mL de façon à former une deuxième couche.
- Laisser solidifier.
- Incuber à (44,0 ± 1,0)°C pendant 18 à 24 heures.

LECTURE

Les coliformes présentent des colonies roses. Les colonies d'*Escherichia coli* sont violettes. Les autres entérobactéries capables de cultiver à 44°C sont blanches.

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

FORMULE - TYPE

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone .....8,00 g
- Extrait autolytique de levure.....3,00 g
- Sels biliaires.....0,80 g
- Chlorure de sodium.....1,00 g
- Phosphate dipotassique.....0,60 g
- Phosphate monopotassique .....0,20 g
- Sulfate de magnésium .....0,20 g
- BCIG .....0,05 g
- Rose-galactopyranoside .....0,15 g
- Agar agar bactériologique.....10,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 $\pm$ 0,2.

CONTRÔLE QUALITE

- Milieu déshydraté : poudre blanc crème, fluide et homogène
- Milieu préparé : gélose blanchâtre.
- Réponse culturale typique après 24 heures d'incubation à 44°C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)	Caractéristiques
Escherichia	ATCC® 25922	$P_R \geq 50\%$	colonies violettes
Escherichia coli	ATCC 15224	$P_R \geq 50\%$	colonies violettes
Escherichia coli (β-glucuronidase négative)	ATCC 43895	$P_R \geq 50\%$	colonies roses
Enterobacter cloacae	ATCC 13047	$P_R \geq 50\%$	colonies roses
Klebsiella pneumoniae	ATCC 23357	$P_R \geq 50\%$	colonies roses
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	inhibée	
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	inhibée	

STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-25°C.

- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.
- Milieu de base préparé en flacons ou en tubes : 1 mois à 2-8°C, à l'abri de la lumière (à titre indicatif).

PRESENTATION

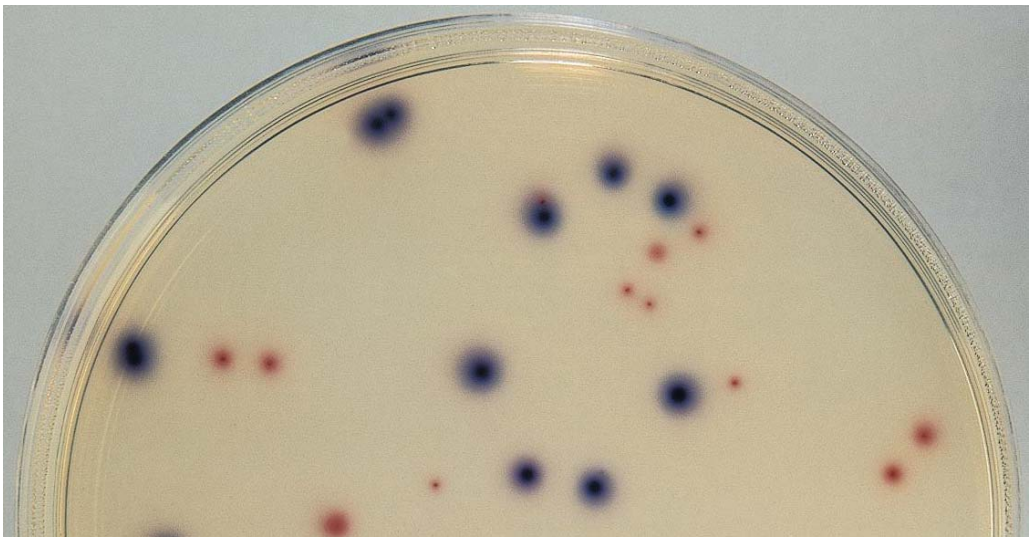
	Code
Milieu déshydraté :	
- Flacon de 100 g	BK142HM
- Flacon de 500 g	BK142HA

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

SUPPORT PHOTO

Référence produit : BK142HA, HM

Utilisation : Dénombrement simultané et spécifique des *Escherichia coli* et coliformes thermotolérants.



***Escherichia coli* + coliformes thermotolérants**

Gélose rose-Gal BCIG
Réf : **BK142HA**
Incubation : 24 heures / 44°C
Caractéristiques : colonies violettes : *E. coli* (Mise en évidence simultanée des β-glucuronidase + β-galactosidase) ;
colonies roses : coliformes thermotolérants (Mise en évidence uniquement de β-galactosidase).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LE MINOR, L. et BEN HAMIDA, F.. 1962. Avantages de la recherche de la β-galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique, en particulier des *Enterobacteriaceae*. Annales de l'Institut Pasteur (Paris), **102** : 267-277.

KILIAN, M. and BÜLOW, P.. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Sect. B **84** : 245-251.

ADAMS, M.R., GRUBB, S.M., HAMER, A., and CLIFFORD, M.N.. 1990. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β-glucuronidase activity. Applied and Environmental Microbiology, **56** : 2021-2024.

MANAFI, M., KNEIFEL, W., and BASCOMB, S.. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiological Reviews, **55** : 335-348.

COIFFIER, O.. 1992. Les bactéries coliformes, p. 303-323, dans les groupes microbiens d'intérêt laitier, CEPIL, Paris.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

Les mentions portées sur l'étiquette sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2007-07-24.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document : BK142/F/2000-12 : 5

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34